



TITLE:

家族性自律神経失調症における
IKBKAP遺伝子の異常スプライシング
を是正させる低分子化合物
RECTASは、同疾患で低下異常を示
すtRNA修飾を回復させる(
Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

吉田, 真弓

CITATION:

吉田, 真弓. 家族性自律神経失調症におけるIKBKAP遺伝子の異常スプライシングを是正させる低分子化合物RECTASは、同疾患で低下異常を示すtRNA修飾を回復させる. 京都大学, 2015, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2015-05-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19208>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は2015-06-01に公開; 許諾条件により要旨は2015-06-01に公開; 許諾条件により本文は2018-10-01に公開

(続紙 1)

京都大学	博士（生命科学）	氏名	吉田 真弓
論文題目	家族性自律神経失調症における <i>IKBKAP</i> 遺伝子の異常スプライシングを是正させる低分子化合物RECTASは、同疾患で低下異常を示すtRNA修飾を回復させる		
(論文内容の要旨)			
<p>家族性自律神経失調症（FD: Familial Dysautonomia）は、神経の発達異常、変性、衰退により、感覚神経と自律神経に障害を持つ先天性・致死性の常染色体劣性遺伝病である。FD 患者は、<i>IKBKAP</i> 遺伝子のイントロン 20 内に共通の一塩基置換を持ち、患者の 99.5% ではこの変異をホモで持つことが知られている。すなわち、この変異により、主に神経系の組織においてエクソン 20 が mRNA に組み込まれない異常スプライシングが起き、正常な <i>IKBKAP</i> タンパク質（IKAP）が産生されなくなることが、病気の原因であると考えられている。タンパク質をコードする部分には変異がないことから、この異常スプライシングを正常化させることが、FD の根本治療に繋がることが期待された。</p> <p>この考えに基づき、申請者は、まず、<i>IKBKAP</i> 遺伝子に FD 変異を持っても、エクソン 20 が含まれるようにスプライシングを操作できる化合物を取得することを目的としたスクリーニング系の構築を試みた。正常ヒト <i>IKBKAP</i> 遺伝子の一部のゲノム領域に対して FD 変異を導入し、その配列を用いて、スプライシングの切り替わりが、GFP と RFP の 2 種類の蛍光タンパク質の発現に反映されるスプライシングレポーターを作製した。このレポーターを SH-SY5Y あるいは HeLa 細胞に発現させ、スプライシングパターンを検討した結果、レポーター由来の mRNA のほとんどがエクソン 20 を含まないものであり、蛍光タンパク質の発現もそのスプライシングパターンを反映したものであった。従って、このスプライシングレポーターは FD 患者における異常スプライシングを再現でき、さらに、蛍光観察によって異常スプライシング判断できると考えられた。</p> <p>続いて、申請者は、この 2 色蛍光スプライシングレポーターを用いて化合物スクリーニングを行い、強くエクソン 20 の含み込み（インクルージョン）を促進させる活性を持つ新規化合物 RECTAS の取得に成功した。また、RECTAS は患者細胞においても濃度依存的に内在性 <i>IKBKAP</i> 遺伝子のエクソン 20 を含ませる活性を有しており、正常な IKAP 量を増加させることがわかった。RECTAS の投与によって IKAP の発現量が回復したことから、その機能も回復するかどうかについて検討を行った。IKAP は転写伸長複合体の構成因子として同定されたタンパク質であったが、近年、出芽酵母を用いた解析から IKAP の酵母ホモログである Elp1 はある種の tRNA のアンチコドンループの wobble 位ウリジンの修飾に関わることが示唆されていた。この示唆に基づき患者細胞における tRNA の修飾を調べたところ、複数の tRNA 種において wobble 位ウリジンの修飾が低下していることがわかった。さらに患者細胞に RECTAS を作用させたところ、<i>IKBKAP</i> 遺伝子のスプライシングを是正し正常な IKAP が増加すると tRNA の修飾が回復し、細胞の増殖能も回復することが観察された。これらのことから、ヒト IKAP は、ある種の tRNA の修飾に関わっていることが明らかになり、さらに、RECTAS によってその機能の回復が可能であることが明らかとなった。本研究により、FD 患者では、<i>IKBKAP</i> 遺伝子のスプライシングが異常になっているだけでなく、tRNA の修飾も低下しているという、RNA が関与する過程が複数異常になっている疾患であることが示された。</p> <p>最後に、どのような作用機序で RECTAS がエクソン 20 のインクルージョンを促進しているのかについて解析するため、申請者は、<i>in vitro</i> スプライシング解析および、エクソナレイによる RECTAS 応答エクソンの解析を行った。その結果、RECTAS は直接スプライシングに作用する化合物であり、また、RECTAS に応答してインクルージョンに向かうエクソンは、元来エクソンとしての認識が弱いエクソンであることが示唆された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

遺伝子変異によって引き起こされる疾患のうち、スプライシング異常に起因するものは 15%以上を占めるという統計がなされており、家族性自律神経失調症 (FD) はその 1 例である。FD は、遺伝性感覚性自律神経性ニューロパチーの III 型に分類される常染色体性劣性の遺伝病であり、主に感覚神経・自律神経において変性・脱落が起こり、様々な症状を呈して若くして死に至る疾患である。これまでに同定された FD 患者は、*IKBKAP* 遺伝子のイントロン 20 に共通の変異を持つ。その変異のためにエクソン 20 がスキップして正常な mRNA が産生されないことが疾患の原因である。FD の場合には、タンパク質をコードするエクソンには変異が無いことから、スプライシング異常を是正させることが疾患治療に繋がることが期待される。これまでの研究において、この異常スプライシングを是正される低分子化合物が報告されていたが、臨床応用が可能なほどの活性は認められておらず、根本的な治療法の開発が待たれていた。また、転写伸長複合体の構成要素として同定された *IKBKAP* 遺伝子産物の生理的機能には不明な点が多く、疾患発症機序もよく分かっていなかった。

本論文では、まず、研究室で開発された 2 色蛍光スプライシングレポーターを応用することにより、生きた細胞内で FD 患者に特異的な異常スプライシングパターンを検出する方法を構築し、それを是正させる低分子化合物をハイスループットにスクリーニングする方法とした。続いて、この方法を用いて低分子化合物のスクリーニングを行い、FD 患者と同じ変異を持たせたレポーター由来の mRNA 前駆体における異常スプライシングを是正させる、RECTAS という低分子化合物を取得することに成功した。RECTAS は、実際に FD 患者由来の線維芽細胞において、内在性の *IKBKAP* 遺伝子の異常スプライシングを是正させる活性を持ち、正常なタンパク質を作らせることが確認された。また、RECTAS は同様の活性を持つ既存の化合物に比しても、強い活性を持つことが示された。さらに、転写伸長複合体の構成要素であるとされていた *IKBKAP* 遺伝子産物が、ヒトにおいて tRNA の修飾に関与するというのを初めて同定し、FD の発症と tRNA 修飾との関連を示した。そして RECTAS は、FD 患者細胞で低下している tRNA 修飾を、異常スプライシングの是正を通じて回復させ得ることを示した。また、RECTAS の作用機序についても実験を行い、RECTAS が直接スプライシングに作用する活性を持つことを示した。さらに、RECTAS に応答するエクソンの配列解析により、RECTAS に応答して mRNA に含まれるエクソンには共通性があり、それらは、元来エクソンとして認識されることが弱い塩基配列を有していることが示唆された。

以上の結果は、これまで有効な治療法が無かった FD に対する新規治療薬となりうる低分子化合物の開発に繋がるものである。また、これまで明らかにならなかった *IKBKAP* 遺伝子産物の機能を明らかにしたもので、FD をはじめとした神経変性疾患発症機序の理解に大きく寄与する独創性・新規性の高いものである。従って、本論文は、博士 (生命科学) の学位論文として価値あるものと認め、平成 27 年 4 月 8 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。

要旨公開可能日：平成 27 年 6 月 1 日